(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2011 年 6 月 9 日 (09.06.2011)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2011/068218 A1

(51) 国際特許分類：
C12Q 1/68 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP20 10/07 1727

(22) 国際出願日： 2010 年 12 月 3 日 (03. 12.2010)

(25) 国際出願の言語： 日本語

(26) 国際公開の言語： 日本語

(30) 優先権データ：
特願 2009-27671 1 200 9 年 12 月 4 日 (04.12.2009) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について) :学校法人帝京大学 (TEIKYO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒1738605 東京都板橋区加賀２丁目１１番１号 Tokyo (JP). 久光製薬株式会社 (HISAMITSU PHAR - MACEUTICAL CO., INC.) [JP/JP]; 〒84 10017 佐賀県鳥栖市田代大官町４０８ Saga (JP).

(72) 発明者 ;および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 槙村 浩一 (MAKIMURA KoichH , [JP/JP]; 〒1920395 東京都八王子市大塚３５９ 学校法人帝京大学医真菌研究センター内 Tokyo (JP). 宮嶋 良治 (MIYAJI-M A Yoshiharu) [JP/JP]; 〒1920395 東京都八王子市大塚３５９ 学校法人帝京大学医真菌研究センター内 Tokyo (JP). 渡辺 晋一 (WATANABE Shinich り [JP/JP]; 〒1738606 東京都板橋区加賀２丁目 1 1 番 1 号 学校法人帝京大学医学部附属病院内 Tokyo (JP).

(74) 代理人 :長谷川 芳樹 , 外 (HASEGAWA Yoshiki et al); 〒1000005 東京都千代田区丸の内二丁目１番 1 号丸の内 ＭＹ ＰＬＡＺＡ (明治安田生命ビル) ９階 創英国際特許法律事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可肯^: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：
– 国際調査報告 (条約第 2 1 条(3))
– 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

(54) Title: KIT AND METHOD FOR IDENTIFICATION OF CAUSATIVE BACTERIUM OF NAIL TINEA

(54) 発明の名称 :爪白癬の起因菌の同定用キットおよびその同定方法

(57) Abstract: Disclosed are a kit and a method for laentiiying a causative bacterium of nail tinea, which can Identiiy tne causative bacterium rapidly and accurately by a real-time PCR method using a primer set and a probe both specific to a bacterium species. Specifically disclosed is a kit for identiiying a causative bacterium of nail tinea, which comprises a primer set and a probe and can identify a causative bacterium of nail tinea by a real-time PCR method, wherein the primer set is at least one selected from the group consisting of a primer set comprising a primer having the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: l and a primer having the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO :2 and a primer set comprising a primer having the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 3 and a primer having the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO:4 and the prove is at least one selected from the group consisting of a probe having the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO:5 and a probe having the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 6.

(57) 要約： 本発明は、菌種特異的なプライマーセットおよびプローブを用い、リアルタイムＰＣＲ法により起因菌を迅速かつ正確に同定することができる爪白癬の起因菌の同定用キットおよび同定方法を提供することを目的とする。プライマーセットおよびプローブを含み、リアルタイムＰＣＲ法を用いて爪白癬の起因菌を同定するための同定用キットであって、プライマーセットが、配列番号 1 の塩基配列を有するプライマーと配列番号２の塩基配列を有するプライマーとからなるプライマーセット、および、配列番号３の塩基配列を有するプライマーと配列番号４の塩基配列を有するプライマーとからなるプライマーセットからなる群より選択される少なくとも一つであり、プローブが、配列番号５の塩基配列を有するプローブ、および、配列番号６の塩基配列を有するプローブからなる群より選択される少なくとも一つである、爪白癬の起因菌の同定用キット。

WO 2011/068218 A1

明　細　書

発明の名称　：爪白癬の起因菌の同定用キットおよびその同定方法

技術分野

[0001] 本発明は、リアルタイムＰＣＲ法を用いた爪白癬の起因菌の同定用キットおよびその同定方法に関する。

背景技術

[0002] 爪白癬は爪の真菌感染症の９０％以上を占めており、重症になると爪が白または黄褐色に変色し、肥厚し、爪床から離れていく。爪白癬の起因菌は様々であるが、紅色白癬菌（トリコフィトン っレブルム）および毛瘡白癬菌（トリコフィトン・メンタグロフアイテス）の２菌種が分離された起因菌の殆どを占めている（非特許文献１）。爪白癬の治療には、テルビナフイン、ィトラコナゾール、グリセオフルビン等の経口抗真菌薬や、イミダゾール系、ァリルアミン系、ベンジルァミン系、チォカルバミン酸系等の外用抗真菌薬が用いられている。しかしながら、爪白癬は、通常の足白癬または体部白癬に比べて完治しにくく、特に既存の外用抗真菌薬の有効性が低いという問題点がある。爪白癬の治療効果を向上させるためには、起因菌の早期特定および的確な抗真菌剤の選定が不可欠である。

[0003] 爪白癬を含む白癬の診断には、患部から爪や角質等の試料を採取し、顕微鏡で観察して菌要素の有無を確認するＫＯＨ直接鏡検法と、選択培地上で数週間培養してコロニーや菌の微細構造を観察することにより菌種を同定する培養法とがある。しかし、ＫＯＨ直接鏡検法による診断には熟練が必要のうえ、基本的には菌種を同定できない。一方、培養法は菌種の同定はできるものの、数週間という長い期間を要し、培養陽性率も低く、さらに形態学的な同定には熟練を必要とする。

[0004] 別の白癬の診断方法として、例えば、爪白癬患者の爪甲から抽出した白癬菌ァクチンｍＲＮＡをリアルタイムＰＣＲで定量し白癬菌の検出と菌量の推定を試みる方法がある（非特許文献２）。しかし、この方法はｍＲＮＡを検

出対象としているため取扱いの利便性に欠ける。

[0005] さらに、爪真菌症の起因菌を正確に検出できる診断法として、第１回ＰＣＲおよびｎｅｓｔｅｄ＿ＰＣＲを行う方法が開示されている（特許文献１）。しかし、この方法は電気泳動を必要とするため大量検体の処理には適さない。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献１：特開２００８＿０６７６０５号公報

非特許文献

[0007] 非特許文献１：西本勝太郎：真菌誌　４７：１０３—１１１，２００６

非特許文献2：坪井良治：臨皮　５７（５）：９４-９７，２００３

発明の概要

発明が解決しょうとする課題

[0008] ウィルスや病原菌の検出にはリアルタイムＰＣＲ法を用いることがある。リアルタィムＰＣＲ法は、サーマルサイクラーと蛍光検出器を一体化した機器を用いてＰＣＲによるＤＮＡの増幅と蛍光による増幅産物の検出を同時に行う手法である。この方法は、電気泳動による増幅産物の確認を必要としないため、簡便でかつ迅速に結果が得られ、コンタミネーシヨンのリスクも低いという利点がある。し九し、これまで爪白癬の起因菌をリアルタイムＰＣＲ法で感度良く定量的に検出・同定するための方法はなかった。

[0009] したがって、本発明は、菌種特異的なプライマーセットおよびプローブを用い、リアルタイムＰＣＲ法により起因菌を迅速かつ正確に同定することができる、爪白癬の起因菌の同定用キットおよびその同定方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[001 0] 本発明者は、上記課題を解決するため鋭意研究の結果、爪白癬の起因菌のリボゾーマルＤＮＡのＩＴＳ１領域に特異的なプライマーセットおよびプロ

—ブを用いて、リアルタイムＰＣＲを行うことで迅速かつ正確に爪白癬の起因菌を同定できることを見出し、本発明の完成に至った。

[001 1] すなわち、本発明は、プライマーセットおよびプローブを含み、リアルタイムＰＣＲ法を用いて爪白癬の起因菌を同定するための同定用キットであつて、プライマーセットが、配列番号１の塩基配列を有するプライマーと配列番号２の塩基配列を有するプライマーとからなるプライマーセット、および、配列番号３の塩基配列を有するプライマーと配列番号４の塩基配列を有するプライマーとからなるプライマーセットからなる群より選択される少なくとも一つであり、プローブが、配列番号５の塩基配列を有するプローブ、および、配列番号６の塩基配列を有するプローブからなる群より選択される少なくとも一つである、爪白癬の起因菌の同定用キットを提供する。

[001 2] 配列番号１の塩基配列を有するプライマーと配列番号２の塩基配列を有するプライマーとからなるプライマーセットによれば、真菌全般（ｕｎｉｖｅｒｓａｌ）のリボゾーマルＤＮＡのＩＴＳ１領域の全長（およそ３５０ｂｐ）を増幅することができ、また、配列番号３の塩基配列を有するプライマーと配列番号４の塩基配列を有するプライマーとからなるプライマーセットによれば、主な起因菌である紅色白癬菌（Ｔｒｉｃｈｏｐｈｙｔｏｎ ｒｕｂｒｕｍ）および毛瘡白癬菌（Ｔｒｉｃｈｏｐｈｙｔｏｎ ｍｅｎｔａｇｒｏｐｈｙｔｅｓ）のリボゾーマルＤＮＡのＩＴＳ１領域の一部（およそ１５０ｂｐ）を特異的に増幅することができる。

[001 3] 配列番号５の塩基配列を有するプローブによれば、毛瘡白癬菌のリボゾーマルＤＮＡのＩＴＳ１領域に特異的に検出でき、配列番号６の塩基配列を有するプローブによれば、紅色白癬菌のリボゾーマルＤＮＡのＩＴＳ１領域に特異的に検出することができる。

[001 4] したがって、本発明の同定用キットによれば、主な爪白癬の起因菌である紅色白癬菌（Ｔｒｉｃｈｏｐｈｙｔｏｎ ｒｕｂｒｕｍ）および毛瘡白癬菌（Ｔｒｉｃｈｏｐｈｙｔｏｎ ｍｅｎｔａｇｒｏｐｈｙｔｅｓ）を迅速九つ正確に同定することができる。

[001 5] 本発明は、また、被検者より採取した爪から全ＤＮＡを抽出する工程と、爪白癬の起因菌のリボゾーマルＤＮＡのＩＴＳ１領域に特異的な、プライマーセットおよびプローブを用意する工程と、リアルタイムＰＣＲ法を用いて、プライマーセットによって抽出した全ＤＮＡにおける爪白癬の起因菌のリボゾーマルＤＮＡのＩＴＳ１領域を増幅すると同時に、プローブによって増幅したＤＮＡを検出し、菌種を同定する工程とを含む、爪白癬の起因菌の同定方法を提供する。本発明の同定方法によれば、爪白癬の起因菌を迅速かつ正確に同定することができる。

[001 6] 本発明の同定方法において、上記プライマーセットが、配列番号１の塩基配列を有するプライマーと配列番号２の塩基配列を有するプライマーとからなるプライマーセット、および、配列番号３の塩基配列を有するプライマーと配列番号４の塩基配列を有するプライマーとからなるプライマーセットからなる群より選択される少なくとも一つであることが好ましい。配列番号１の塩基配列を有するプライマーと配列番号２の塩基配列を有するプライマーとからなるプライマーセットによれば、より広範囲の起因菌を同定することができ、配列番号３の塩基配列を有するプライマーと配列番号４の塩基配列を有するプライマーとからなるプライマーセットによれば、主な２種類爪白癬の起因菌、すなわち、紅色白癬菌（Ｔｒｉｃｈｏｐｈｙｔｏｎ ｒｕｂｒｕｍ）および毛瘡白癬菌（Ｔｒｉｃｈｏｐｈｙｔｏｎ ｍｅｎｔａｇｒｏｐｈｙｔｅｓ）を正確に効率よく同定することができる。また、プライマーセットは目的に応じて２種類の混合物を使用してもよい。

[001 7] 本発明の同定方法において、上記プローブが、配列番号５の塩基配列を有するプローブ、および配列番号６の塩基配列を有するプローブからなるプライマーセットからなる群より選択される少なくとも一つであることが好ましい。プローブは目的に応じて、１種類または２種類の混合物を使用してもよい。２種類の混合物を使用する場合、一回のリアルタイムＰＣＲで同時に２菌種の同定を可能とする。

発明の効果

[001 8] 本発明の同定用キットおよび同定方法によれば、従来のＫＯＨ直接鏡検法または培養法に比べて、高度の熟練や数週間の培養期間が不要となるため、より簡便で迅速な爪白癬の起因菌の同定が可能となる。また、従来のｎｅｓｔｅｄ＿ＰＣＲによる同定に比べても、定量性、検出精度、および菌種特異性が向上されるうえ、電気泳動を必要としないため所要時間が大幅に短縮できるという利点がある。

発明を実施するための形態

[001 9] 本発明の同定方法は、被検者より採取した爪から全ＤＮＡを抽出する工程と、爪白癬の起因菌のリボゾーマルＤＮＡのＩＴＳ１領域に特異的な、プライマーセットおよびプローブを用意する工程と、リアルタイムＰＣＲ法を用いて、プライマーセットによって抽出した全ＤＮＡにおける爪白癬の起因菌のリボゾーマルＤＮＡのＩＴＳ１領域を増幅すると同時に、プローブによつて増幅したＤＮＡを検出し、菌種を同定する工程とを含む。

[0020] 本発明の同定方法によって同定できる爪白癬の起因菌は特に限定されない九 紅色白癬菌 (トリコフィトン'ルブルム ;Ｔｒｉｃｈｏｐｈｙｔｏｎ ｒｕｂｒｕｍ ）、毛瘡白癬菌 (トリコフィトン・メンタグロファイテス ;Ｔｒｉｃｈｏｐｈｙｔｏｎ ｍｅｎｔａｇｒｏｐｈｙｔｅｓ)、崖色白き菌 (トリコフィトン - ビオラセゥム ;Ｔｒｉｃｈｏｐｈｙｔｏｎ ｖｉｏｌａｃｅｕｍ)、岩穴状白癬菌 (トリコフィトン・トンズランス ;Ｔｒｉｃｈｏｐｈｙｔｏｎ ｔｏｎｓｕｒａｎｓソ、アソレスロ丁ソレマ・/ハンブソレセ;;ご (Ａｒｔｈｒｏｄｅｒｍａ ｖａｎｂｒｅｕｓｅｇｈｅｍｉｉ)、ズソレスロ丁ソレマ・ベリ,ハヱイ (Ａｒｔｈｒｏｄｅｒｍａ ｂｅｎｈａｍｉａｅ)、イヌ小胞子菌 (ミクロスポソレム・カニス ;Ｍｉｃｒｏｓｐｏｒｕｍ ｃａｎｉｓ)、石膏状小胞子菌 (ミクロスポルム・ギプセゥム ;Ｍｉｃｒｏｓｐｏｒｕｍ ｇｙｐｓｅｕｍ)、および鼠径表皮菌 (エピデルモフィトン・フロッコ－ズム ;Ｅｐｉｄｅｒｍｏｐｈｙｔｏｎ ｆｌｏｃｃｏｓｕｍ)が牽げられる。特に、紅色白癬菌および毛瘡白癬菌が分離された爪白癬の起因菌の９割以上を占めているため、この２種類の菌種を同定できることは爪白癬の治療

において重要な意義がある。

[0021] 本発明の同定方法は、爪白癬患者または患者の疑いのあるヒトの爪を検体とする。爪検体は、ニッパーや爪切り等で切り取ることによって採取すればよい。爪検体の量は、リアルタイムＰＣＲ（Ｒｅａｌ—ｔｉｍｅ ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ ｃｈａｉｎ ｒｅａｃｔｉｏｎ）の鋳型として十分量のＤＮＡを抽出できる量であればいい。爪の厚みや湿度で変化し得るがおよそ２Ｘ２ｍｍ、或いはおよそ５〜１Ｏｍｇ採取すればよい。

[0022] 爪検体から全ＤＮＡを抽出するには、常法で行うことができ、例えば爪をビーズショックにより粉砕し、１００°Ｃで１０分間煮沸等により殺菌した後、フエノール／クロロホルムで抽出し、エタノールで沈澱することにより行うことができる。抽出した全ＤＮＡを必要に応じて市販の核酸定量キットで定量してもよい。

[0023] 本発明の同定方法に使用されるプライマーセットは、爪白癬の起因菌のリボゾーマルＤＮＡのＩＴＳ１（ｉｎｔｅｒｎａｌ ｔｒａｎｓｃｒｉｂｅｄ ｓｐａｃｅｒ １）領域に特異的なものであれば特に限定されない。ＩＴＳ１領域は転写されない領域であり、転写される他の領域（例えば、２８Ｓ領域など）に比べて種の進化の段階でＤＮＡ配列の多様性を獲得しやすいため、菌種に限定した特異性の高い配列を保持していると考えられている。当業者は周知の方法、例えば、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ： Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ （３ｒｄ Ｅｄ．） Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓに記載の方法を用いて、爪白癬の起因菌のリボゾーマルＤＮＡのＩＴＳ１領域の塩基配列に基づき、本発明の同定方法に使用されるプライマーセットを適宜に設計することができる。プライマーの長さは好ましくは１５〜３０ｂｐであり、より好ましくは１８〜２５ｂｐであり、ＧＣ含量は好ましくは４０〜６０％、より好ましくは５０％前後である。Ｔｍ値は所望のＰＣＲアニーリング温度により5〜１０℃高く設定することが好ましく、本発明の同定方法においてアニーリング温度が好ましく６０〜６５℃であり、Ｔｍ値が６５〜７０℃

であることが好ましい。プライマーセットによって増幅されるＤＮＡ配列の長さは５０～４００ｂｐであればよく、好ましくは約１５０ｂｐ以下であることが好ましい。

[0024] 広範囲の真菌の菌種を同定するためには、真菌リボゾームＤＮＡのＩＴＳ１領域の特異的配列に相補的であり、真菌全般（ｕｎｉｖｅｒｓａｌ）のリボゾームＤＮＡのＩＴＳ１領域を特異的に増幅するプライマーセットを使用することが好ましい。例えば、配列番号１の塩基配列を有するプライマー（ｄｅｒｍａＦ）と配列番号２の塩基配列を有するプライマー（ｄｅｒｍａＲ）とからなるプライマーセットは、殆どの真菌のリボゾーマルＤＮＡのＩＴＳ１領域の全長（およそ３５０ｂｐ）を増幅することができるため好ましく用いられる。

[0025] 一方、爪白癬の起因菌の９割以上を占める主な起因菌である紅色白癬菌（Ｔｒｉｃｈｏｐｈｙｔｏｎ ｒｕｂｒｕｍ）および毛瘡白癬菌（Ｔｒｉｃｈｏｐｈｙｔｏｎ ｍｅｎｔａｇｒｏｐｈｙｔｅｓ）にターケットを狭つて効率よく検出・同定するためには、これらの菌種に限定した特異的なプライマーセットを使用することが好ましい。例えば、配列番号３の塩基配列を有するプライマー（ｄｅｒｍａＦ２）と配列番号４の塩基配列を有するプライマー（ｄｅｒｍａＲ２）とからなるプライマーセットは、紅色白癬菌および毛瘡白癬菌のリボゾーマルＤＮＡのＩＴＳ１領域の一部（およそ１５０ｂｐ）を特異的に増幅することができるため、好ましく用いられる。また、毛瘡白癬菌と同じく系統分類上のグループＩに属するＡｒｔｈｒｏｄｅｒｍａ ｖａｎｂｒｅｕｓｅｇｈｅｍｉｉやＡｒｔｈｒｏｄｅｒｍａ ｓｉｍｉｉもこのプライマーセットによって増幅される。このプライマーセットによる増幅産物はｕｎｉＶｅｒｓａｌプライマーセットによる増幅産物に比べて配列が短いため、リアルタイムＰＣＲに要する時間が短縮でき、主な爪白癬の起因菌の同定を正確かつ効率よく行うことを可能とする。

[0026] 配列番号１：５'－ＴＡＡＣＡＡＧＧＴＴＣＣＧＴＡＧＧＴＧＡＡＣＣＴ―３，

配列番号２：５'－ＴＣＧＣＴＧＣＧＴＴＣＴＴＣＡＴＣＧＡ－３'

配列番号３：５'－ＳＳＣＣＣＣＡＴＴＣＴＴＧＴＣＴＡＣＭＴＹＡＣ－３，

配列番号４：５'－ＡＡＣＧＣＴＣＡＧＡＣＴＧＡＣＡＧＣＴＣＴＴＣ－３，

[0027] 本発明の同定方法に使用されるプローブは、爪白癬の起因菌のリボゾーマルＤＮＡのＩＴＳ１領域に特異的なものであれば特に限定されない。当業者は周知の方法、例えば、Ｗｏｏｔｔｏｎら（Ｆｅｄｅｒｈｅｎ Ｓ．Ａｎａｌｙｓｉｓ ｏｆ ｃｏｍｐｏｓｉｔｉｏｎａｌｌｙ ｂｉａｓｅｄ ｒｅｇｉｏｎｓ ｉｎ ｓｅｑｕｅｎｃｅ ｄａｔａｂａｓｅｓ．Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏに １９９６；２６６：５５４－７１）の方法を用いて、様々な爪白癬の起因菌のリボゾーマルＤＮＡのＩＴＳ１領域の配列に基づいて、菌種特異的なプローブを検索し、設計することができる。プローブの長さは特に限定されておらず、また、特異的な領域の塩基配列の長さやＧＣ含量、Ｔｍ値によって変動し得るが、１０～５０ｍｅｒであることが好ましい。プローブのＴｍは好ましくプライマーのＴｍ値より高く、より好ましくはそれより１０℃ほど高い。また、Ｔｍの上昇および特異性の向上のため、例えばＭＧＢ（Ｍｉｎｏｒ Ｇｒｏｏｖｅ Ｂｉｎｄｅｒ；アプライドバイオシステムズジャパン社製）を結合させてもよい。

[0028] 毛瘡白癬菌（Ｔｒｉｃｈｏｐｈｙｔｏｎ ｍｅｎｔａｇｒｏｐｈｙｔｅｓ）のリボゾーマルＤＮＡのＩＴＳ１領域に特異的にハイブリダィズするプローブとしては、配列番号５の配列を有するものが好ましい。このプローブによれば、毛瘡白癬菌であるかどうかを正確に同定することができる。また、毛瘡白癬菌の有性世代であるＡｒｔｈｒｏｄｅｒｍａ ｖａｎｂｒｅｕｓｅｇｈｅｍｉｉもこのプローブによって検出されるが、両者は臨床症状も治療法も同じであるため、臨床上両者をさらに区別・同定する必要はない。また、紅色白癬菌（Ｔｒｉｃｈｏｐｈｙｔｏｎ ｒｕｂｒｕｍ）のリボゾーマルＤＮＡのＩＴＳ１領域に特異的にハイブリダィズするプローブとしては、配

列番号６の配列を有するものが好ましい。このプローブによれば、紅色白癬菌であるかどうかを正確に同定することができる。また、Ｔｒｉｃｈｏｐｈｙｔｏｎ　ｖｉｏｌａｃｅｕｍもこのプローブとハイブリダイズする。両者を区別するには、ＩＴＳ１領域の塩基配列（ＧｅｎｅＢａｎｋ　Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ　Ｎｏ．ＡＢ５２０８４０およびＡＢ１９４２４６）を比較すること（例えば、ＰＣＲ増幅産物のシークエンシングを行うこと）によって達成できる九　爪白癬の起因菌としてＴｒｉｃｈｏｐｈｙｔｏｎ　ｖｉｏｌａｃｅｕｍはごく稀であるため、臨床上両者を区別・同定する意味が殆どない。さらに、全真菌のリボゾーマルＤＮＡのＩＴＳ１領域に特異的にハイブリダィズするプローブとしては、配列番号７の配列を有するものが好ましい。このプローブによって表在性真菌を広範囲に検出することができ、また定量することにより、表在性真菌の全体量や爪白癬の起因菌が全真菌における割合も確認することができる。

[0029] 配列番号５　:5'-ＣＴＣＴＣＴＴＴＡＧＴＧＧＣＴＡＡＡＣ-3'

配列番号６　:5'-ＣＧＣＧＣＴＣＣＣＣＣＴＧＣ-3'

配列番号７　:5'-ＴＴＹＡＡＣＡＡＹＧＧＡＴＣＴＣＴ-3'

[0030] 本発明の同定方法に使用されるプローブはリアルタイムＰＣＲによって検出されるために標識する必要がある。標識プローブは当業者がリアルタイムＰＣＲシステムによって任意に選択できるが、ＴａｑＭａｎ（商標）プローブが好ましく用いられる。ＴａｑＭａｎ（商標）プローブは、標的ＤＮＡに特異的にハイブリダィズする塩基配列の5'末端に蛍光色素、3'末端にクエンチヤー（消光色素）およびＭＧＢ（Ｍｉｎｏｒ　Ｇｒｏｏｖｅ　Ｂｉｎｄｅｒ）によって標識したプローブである。蛍光色素としては、ＦＡＭ（商標）、ＶＩＣ（商標）、ＮＥＤ（商標）、ＪＯＥ（商標）、ＴＡＭＲＡ（商標）、Ｃｙ_３、ＲＯＸ（商標）、Ｔｅｘａｓ　Ｒｅｄ（商標）、およびＣｙ_５などが挙げられる。

[0031] ＴａｑＭａｎ（商標）プローブは、そのままの状態では、プローブ上にクエンチヤーが存在するため、励起光を照射しても蛍光の発生は抑制される。

し力し、リアルタイムＰＣＲの増幅反応中において、ＴａｑＭａｎ（商標）プローブがァニー リングステップで錶型ＤＮＡに特異的にハイプリダイズし、さらに、伸長反応ステップの際に、Ｔａｑ　ＤＮＡポリメラーゼのもつ5'→3'エキソヌクレアーゼ活性により、錶型にハイブリダィズしたＴａｑＭａｎプローブが分解されると、蛍光色素がプローブから遊離し、クエンチヤーによる抑制が解除されて蛍光が発せられ、リアルタィムＰＣＲシステムによって検出される。また、検出される蛍光強度はサンプル中の標的ＤＮＡのコピー数に依存するため、検体中の菌体由来ＤＮＡを定量することもできる。

[0032] 本発明において、目的に応じてプライマーセットおよびプローブを選択することができる。主な起因菌であるかどうかを確認する場合、配列番号3の塩基配列を有するプライマーと配列番号4の塩基配列を有するプライマーとからなるプライマーセットと、配列番号5および／または配列番号6の配列を有するプローブとの組み合わせが好ましい。稀な起因菌を含めた広範囲の真菌の同定には、配列番号1の塩基配列を有するプライマーと配列番号2の塩基配列を有するプライマーとからなるプライマーセットと、例えば配列番号5および／または配列番号6の配列を有するプローブなど各種起因菌に特異的なプローブとの組み合わせが好ましい。また、一つのプライマーセットおよび一つのプローブを添加した系（シングル系）のほか、複数のプライマーセットおよび複数のプローブを添加した系（マルチ系）を用いて複数の菌種を同時に同定することも可能である。マルチ系の場合、プライマーやプローブ同士が干渉し、検出感度が低下する可能性があるため、使用するプライマーやプローブの配合比や濃度を検討する必要がある。

[0033] 本発明において、起因菌の菌種の同定は以下のように行われる。シングル系においては、プローブから遊離した蛍光色素が検出された場合、被験起因菌は当該プローブの特異的な菌種であると判定し、蛍光色素が検出されなかった場合、被験起因菌は当該プローブの特異的な菌種でないと判定する。マルチ系においては、複数のプローブが異なる蛍光色素によって標識されるた

め、検出された蛍光色素の種類に基づき、被験起因菌は当該蛍光色素が標識したプローブの特異的な菌種であると判定する。また、ＤＮＡの抽出・精製の失敗による偽陰性を排除するためには、内部標準物 (インターナルコントロール）を使用してもよい。インターナルコントロールとしては当業者が適切に選択・モディファイすることができ、例えば、Ｖｏｌｌｍｅｒらが開発したＲＮＡ用インターナルコントロール (Ｅｖａｌｕａｔｉｏｎ ｏｆ ｎｏｖｅｌ ｂｒｏａｄ―ｒａｎｇｅ ｒｅａｌ―ｔｉｍｅ ＰＣＲ ａｓｓａｙ ｆｏｒ ｒａｐｉｄ ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ ｏｆ ｈｕｍａｎ ｐａｔｈｏｇｅｎｉｃ ｆｕｎｇｉ ｉｎ ｖａｒｉｏｕｓ ｃｌｉｎｉｃａｌ ｓｐｅｃｉｍｅｎｓ．Ｊ Ｃｌｉｎ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ． ２００８ Ｊｕｎ；４６（６）：１９１９-２６． Ｅｐｕｂ ２００８ Ａｐｒ ２．）をＤＮＡ用にモディファイすることができる。

[0034] 本発明の同定キットは、プライマーセットおよびプローブを含み、リアルタイムＰＣＲ法を用いて爪白癬の起因菌を同定するための同定用キットである。プライマーセットが、配列番号１の塩基配列を有するプライマーと配列番号２の塩基配列を有するプライマーとからなるプライマーセット、および、配列番号３の塩基配列を有するプライマーと配列番号４の塩基配列を有するプライマーとからなるプライマーセットからなる群より選択される少なくとも一つであり、プローブが、配列番号５の塩基配列を有するプローブ、および、配列番号６の塩基配列を有するプローブからなる群より選択される少なくとも一つである。

[0035] 本発明の同定キットは、上記特定のプライマーセットおよびプローブのほか、一般的なリアルタイムＰＣＲ用キットに含まれる試薬、例えば、ＤＮＡポリメラーゼ、ｄＮＴＰ、バッファー、ポジティブコントロールテンプレートなどが含まれてもよい。使用利便性の観点から、ＰＣＲおよび蛍光検出するための試薬が全て適量でミックスされている状態で提供されることが好ましい。

[0036] 本発明の同定キットは、同定目的に応じたプライマーセットおよびプロー

ブの組合せを含むことが好ましい。主な爪白癬の起因菌を同定するためのキットは、配列番号３の塩基配列を有するプライマーと配列番号４の塩基配列を有するプライマーとからなるプライマーセットと、配列番号５または配列番号６の塩基配列を有するプローブとの組合せが好ましく使用される。稀な起因菌を同定するためのキットは、配列番号１の塩基配列を有するプライマ- と配列番号２の塩基配列を有するプライマーとからなるプライマーセットは好ましく含まれる。

[0037] 複数のプライマーセットおよびプローブが含まれる同定キットは、一回のリアルタイムＰＣＲで複数の起因菌を同定できるため好ましい。この場合、プライマーセット同士やプローブ同士の干渉による検出感度の低下を防ぐため、ポジティブコントロールによって決定された最適な配合比および配合濃度のプライマーセットおよびプローブを含むキットが好ましい。

実施例

[0038] 以下、実施例を挙げて、本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

[0039] (実施例１) プライマーセットおよびプローブの菌種特異性

爪白癬の起因菌のリボゾーマルＤＮＡのＩＴＳ１領域の配列に特異的なプライマーセットおよびプローブを用いて、リアルタイムＰＣＲを行い、菌種特異性を検討した。プライマーセットは、 (1) 配列番号１の塩基配列を有するプライマーと配列番号２の塩基配列を有するプライマーとからなるプライマーセット (ｄｅｒｍａＦ／ｄｅｒｍａＲ) 、および、 (2) 配列番号３の塩基配列を有するプライマーと配列番号４の塩基配列を有するプライマーとからなるプライマーセット (ｄｅｒｍａＦ２／ｄｅｒｍａＲ２) の２種類を使用した。インターナルコントロール用プライマーセットとして、配列番号８の塩基配列を有するプライマーと配列番号９の塩基配列を有するプライマーとからなるプライマーセット (ＭＳ２―ＴＭ３―Ｆ／ＭＳ２_ＴＭ３_Ｒ) を使用した。プライマーは全てシグマアルドリッチジャパン株式会社より購入した。

dermaF : 5' -TAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCT-3'

dermaR: 5' -TCGCTGCGTTCTTCATCGA-3'

dermaF2 : 5' -SSCCCCATTCTTGTCTACMTYAC-3'

dermaR2 : 5' -AACGCTCAGACTGACAGCTCTTC-3'

MS2-TM3-F : 5' - GGCTGCTCGCGGATACCC-3'

MS2-TM3-R: 5' -TGAGGGAATGTGGGAACCG -3'

[0040] プローブは、 (1) 配列番号5の塩基配列の5' 末端にFAM (商標) 蛍光色素、3' 末端にNFQおよびMGBによって標識したTaqMan (商標) プローブ (TME_ITS1F) 、 (2) 配列番号6の塩基配列の5' 末端にVIC (商標) 蛍光色素、3' 末端にNFQおよびMGBによって標識したTaqMan (商標) プローブ (TRU_ITS1V) 、 (3) 配列番号7の塩基配列の5' 末端にNED (商標) 蛍光色素、3' 末端にNFQおよびMGBによって標識したTaqMan (商標) プローブ (FU—ITS1N) の3種類を使用した。 (4) インターナルコントロール用プローブとして、配列番号10の塩基配列の5' 末端にCy5蛍光色素、3' 末端にBHQ3によって標識したTaqMan (商標) プローブ (MS2—TM2-Cy5) を使用した。なお、NFQ (Non—fluorescent Quencher ;商標) もBHQ3 (Black Hole Quencher 3 ;商標) も非蛍光性消光剤 (クエンチャー) である。プローブはアプライドバイオシステムズジャパン株式会社およびシグマアルドリツチジャパン株式会社より購入した。

TME-ITS1F: 5' - [FAM] -CTCTCTTTAGTGGCTAAAC- [NFQ-MGB] -3'

TRU-ITS1V : 5' - [VIC] CGCGCTCCCCCTGC- [NFQ-MGB] -3'

FU-ITS1N: 5' - [NED] TTYAACAAYGGATCTCT- [NFQ-MGB] -3'

MS2-TM2-Cy5 : 5' - [Cy5] -ACCTCGGGTTTCCGTCTTGCTCGT- [BHQ3] -3'

[0041] 皮膚糸状菌などの様々な常在菌を各菌株保存施設より入手した。これらの菌株を通常の培養方法にしたがって培養し、フエノール／クロロホルム法で全DNAを抽出した。それぞれの全DNAをインビトロジェン社Qubit

定量キットにより定量し、０．３ｐｇ（概ね１００コピーのリポソーマルＤＮＡ遺伝子に相当する量）を鋳型とし、リアルタイムＰＣＲシステム７５００Ｆａｓｔ（アプライドバイオシステムズジャパン株式会社）を用いてリアルタイムＰＣＲを行った。反応液（１９μＬＸ５０反応分）の組成は以下の通りである。ウェルに１９μＬずつ分注し、上記抽出したＤＮＡを１μＬずつ入れた。

水	３５７　μＬ
プライマー（３０μＭ）Ｘ４	６．５　μＬＸ４
ＲＯＸ　Ｒｅｆｅｒｅｎｃｅ　Ｄｙｅ　ＩＩ	２０　μＬ
プローブ（１５）μＭ）Ｘ４	２０　μＬＸ４
Ｐｒｅｍｉｘ	５００　μＬ
合計	９５０　μＬ

[0042] リアルタイムＰＣＲシステムの操作はメーカ取扱説明書に従った。初期ホールドは９５℃、３０秒、ＰＣＲ反応は、９５℃で１０秒、６０℃で３０秒を６０サイクル行った。リアルタイムＰＣＲの結果は表１に示した。増幅が見られた場合（陽性）を「＋」で示し、増幅が見られなかった場合（陰性）を「－」で示した。

[0043]

ほ 1]

primer pairs	dermaF/dermaR			dermaF2/dermaR2	
probes	FU-ITS 1N	TRU-ITS 1V	TME-ITS 1F	TRU-ITS1V	TME-ITS1F
Dermatophytes					
Trichophyton rubrum T99	+	+	−	+	−
Trichophyton rubrum T108	+	+	−	+	−
Trichophyton rubrum 4-21 (Hasegawa)	+	+	−	+	−
Trichophyton rubrum 4-23 (Hasegawa)	+	+	−	+	−
Trichophyton rubrum 4-25 (Hasegawa)	+	+	−	+	−
Trichophyton rubrum 4-26 (Hasegawa)	+	+	−	+	−
Trichophyton mentagrophytes T7	+	−	+	−	+
Trichophyton mentagrophytes T9	+	−	+	−	+
Arthroderma vanbreuseghemii TIMM2789	+	−	+	−	+
Trichophyton tonsurans T117	+	−	−	−	−
Arthroderma benhamiae SM103	+	−	−	−	−
Microsporum canis TDGS945	+	−	−	−	−
Microsporum canis TDGS0222	+	−	−	−	−
Microsporum canis TDGS0223	+	−	−	−	−
Microsporum canis TDGS0269	+	−	−	−	−
Microsporum gypseum TDGS0009	+	−	−	−	−
Microsporum gypseum TDGS0012	+	−	−	−	−
Epidermophyton floccosum 5-14 (Hasegawa)	+	−	−	−	−
Epidermophyton floccosum 5-22 (Hasegawa)	+	−	−	−	−
Other pathogenic fungi					
Candida albicans ATCC10231	+	−	−	−	−
Candida albicans TIMM1768	+	−	−	−	−
Candida albicans ATCC90028	+	−	−	−	−
Candida glabrata ATCC90030	+	−	−	−	−
Candida glabrata CBS138	+	−	−	−	−
Candida tropicalis ATCC750	+	−	−	−	−
Candida tropicalis TLCS S 9/1	+	−	−	−	−
Candida parapsilosis ATCC2209	+	−	−	−	−
Candida parapsilosis ATCC90018	+	−	−	−	−
Aspergillus fumigatus TIMM0108	+	−	−	−	−
Aspergillus fumigatus JCM10253	+	−	−	−	−
Aspergillus fumigatus TIMM2920	+	−	−	−	−
Aspergillus flavus TIMM0059	+	−	−	−	−
Aspergillus flavus TIMM2935	+	−	−	−	−
Aspergillus niger TIMM0113	+	−	−	−	−
Aspergillus niger TIMM2915	+	−	−	−	−
Paecilomyces variotii TIMM3182	+	−	−	−	−
Pseudallescherichia boydii TIMM0886	+	−	−	−	−
Fusarium oxysporum TSY-0351	+	−	−	−	−
Fusarium solani TSY-0403	+	−	−	−	−
Fusarium verticillioides TSY-0219	+	−	−	−	−
Chaetomium globosum TSY-0369	+	−	−	−	−
Exophiala jeanselmei TSY-0396	+	−	−	−	−
Cryptococcus neoformans ATCC90113	+	−	−	−	−
Cryptococcus neoformans TJane	+	−	−	−	−
Trichosporon asahii CBS2479	+	−	−	−	−
Rhizopus oryzae TIMM0921	+	−	−	−	−

[0044] 表１から、本検出系では、ＩＴＳ１領域の全長を増幅するｄｅｒｍａＦ／

ｄｅｒｍａＲプライマーとＦＵ＿ＩＴＳ１Ｎプローブにより広範囲の真菌を検出した。また、ｄｅｒｍａＦ／ｄｅｒｍａＲまたはｄｅｒｍａＦ２／ｄｅｒｍａＲ２とプローブとのセットで、共に毛瘡白癬菌（Ｔｒｉｃｈｏｐｈｙｔｏｎ ｍｅｎｔａｇｒｏｐｈｙｔｅｓ）、および、紅色白癬菌（Ｔｒｉｃｈｏｐｈｙｔｏｎ ｒｕｂｒｕｍ）を特異的に検出できた。さらに、菌種特異的なプローブは当該菌種のみに反応し、それ以外の菌種には全く反応しなかった（種特異性１００％）。

[0045] （実施例２） リアルタイムＰＣＲの検出感度

爪白癬の起因菌のリボゾーマルＤＮＡのＩＴＳ１領域の配列に特異的なプライマーセットおよびプローブを用いて、本発明の同定方法の検出感度を検討した。ポジティブコントロールとして、インビトロジェン社ＴＯＰＯ ＴＡ Ｃｌｏｎｉｎｇ Ｋｉｔに付属するｐＣＲ２．１ベクターに、Ｔｒｉｃｈｏｐｈｙｔｏｎ ｒｕｂｒｕｍ、Ｔｒｉｃｈｏｐｈｙｔｏｎ ｍｅｎｔａｇｒｏｐｈｙｔｅｓ、およびＡｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｆｕｍｉｇａｔｕｓのＩＴＳ１領域をクローニングしたものを使用した。鋳型濃度を希釈して検出感度の下限を調べた。

[0046] 本検出系においては、各濃度あたり4回繰り返しのレプリケートで再現性を確認した。結果は表２に示した。１回の増幅を「＋」で示し、４回測定において全て増幅が見られた場合、「＋＋＋＋」で示した。

[0047]

ほ 2]

primer pairs	dermaF/dermaR			dermaF2/dermaR2	
probes	FU-ITS1N	TRU-ITS1V	TME-ITS1F	TRU-ITS1V	TME-ITS1F
rDNA コピー数					
400	＋＋＋＋	＋＋＋＋	＋＋＋＋	＋＋＋＋	＋＋＋＋
200	＋＋＋＋	＋＋＋＋	＋＋＋＋	＋＋＋＋	＋＋＋＋
100	＋＋＋＋	＋＋＋＋	＋＋＋＋	＋＋＋＋	＋＋＋＋
50	＋＋＋＋	＋＋＋＋	＋＋＋＋	＋＋＋＋	＋＋＋＋
25	＋＋＋＋	＋	＋＋＋＋	＋＋＋＋	＋＋＋＋
13	＋＋＋＋	＋＋	＋＋＋＋	＋＋＋	＋＋＋＋
6	＋＋＋	＋	＋＋＋	＋	＋＋＋＋
3	＋＋＋	－	＋＋＋	－	＋＋＋

[0048] 錶型が非常に希薄な領域においては有限な時間と少数の分子が関与する確率的なＰＣＲ増幅現象 (ポアソン過程) となるため、陰性／陽性ではなく確率的な値、すなわち検出率で表した。検出系やそれぞれの立場で値は上下するが、一般的にリアルタイムＰＣＲ検出系での検出感度は９０〜９５％が境界として採用されているため、本検出系では１００％検出された錶型濃度をその最低検出感度とした。本検出系において、リポソーマルＤＮＡ３〜５０コピーの錶型があれば１００％増幅する結果となった。これは白癬などの真菌でおよそ１〜２細胞分に相当するため、実用的には十分な感度であると推定される。また、この検出感度は、１００〜５００コピーを必要とするｎｅｓｔｅｄ＿ＰＣＲ法よりも2〜１６６倍感度が高いことが分かった。

[0049] (実施例３ 本発明の同定方法を用いた臨床試験)

爪真菌症未治療の皮膚科患者に熟練した医師により直接鏡検を行い、感染の有無を確認した。感染が確認された患者の爪に対してエタノール消毒後、爪の遠位側を爪切りまたはニッパーで切り取り採取した。採取した爪をビーズショッカー (多検体細胞破砕機) (安井器械株式会社) で粉砕し、糸状菌バッファー (２００ｍＭ Ｔｒｉｓ- ＨＣｌ，ｐＨ ８．０，２５ｍＭ Ｅ

ＤＴＡ，０．５％ＳＤＳ，２５ＯｍＭ　ＮａＣｌ）中で１００℃１０分間煮沸後、フエノール／クロロホルム抽出し、次いでエタノール沈澱してＤＮＡを抽出した。ＤＮＡを５０リＬの超純水に溶解して保存した。得られたＤＮＡ含有液２５μＬを鋳型ＤＮＡサンプルとし、既知の濃度のポジティブコントロールと共に、実施例１の方法と同様にリアルタイムＰＣＲを行った。

[0050] 結果を表３に示した。表中、C_Tは増幅カーブより得られる情報であり、設定された閾値に相当するＰＣＲサイクル数を示す。C_Tよりは検量線法または比較C_T法のいずれかを使用することにより鋳型量の定量的な見積ができる。今回は、大量検体に適した比較C_T法を採用し、そこから算出される鋳型数を示した。なお、比較C_T法はＰＣＲ効率が１００％であると仮定して、既知のポジティブコントロールとのC_Tの差を利用して鋳型数を概算する方法である。この方法は増幅効率の差による定量誤差が生じるというデメリットがある九　対数的な挙動を示すＰＣＲにおいては些末な問題であると考えられる。そして臨床検体においてはソフトウエアＬｉｎＲｅｇＰＣＲ（Ｒｕｉｊｔｅｒ　ＪＭら、Ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ　ｅｆｆｉｃｉｅｎｃｙ：ｌｉｎｋｉｎｇ　ｂａｓｅｌｉｎｅ　ａｎｄ　ｂｉａｓ　ｉｎ　ｔｈｅ　ａｎａｌｙｓｉｓ　ｏｆ　ｑｕａｎｔｉｔａｔｉｖｅ　ＰＣＲ　ｄａｔａ．Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．　２００９　Ａｐｒ；３７（６）：ｅ４５．　Ｅｐｕｂ　２００９　Ｆｅｂ　２２．）により増幅効率を確認したところ、実際には差がほとんどなかったため、比較C_T法を使用した場合において増幅効率は殆ど問題でなく、鋳型のコピー数の概算量を求めることが可能であると判断した。

[0051] 対照として健常人の爪７人分を本発明の同定方法に付したところ、最大でも１００コピー程度の真菌の鋳型量しか検出されなかったため、１００コピー程度は通常でも常在しているものと考え、それ以上を爪白癬診断の目安とした。また、実際に臨床検体で検出された鋳型量はどれも１００コピーを大幅に上回ったため、この基準が適当であると考えた。

[0052] 表３より、熟練した医師により直接鏡検陽性と判断された３３例の爪白癬

爪検体を本発明の同定方法で診断したところ、全例が陽性となった（検出精度１００％）。一方、培養法にて菌種が同定された検体は１５例であり、そのうち１３例が本発明の同定方法の判定結果と一致した。不一致の２例については、本発明の同定方法が種特異性１００％であることから、培養法が誤同定である可能性が考えられた。したがって、培養法による菌種同定が３９％であったのに対し、本発明の同定精度が１００％であった。また、培養法で菌種が同定できなかった残りの１６例については全て菌種同定された。一方、健常爪を本発明の同定方法に付しても白癬菌由来のシグナルは全く検出されず（7例全例）、擬陽性判定がないことも示された。なお、表３中、ＴＲはＴｒｉｃｈｏｐｈｙｔｏｎ ｒｕｂｒｕｍを表し、ＴＭはＴｒｉｃｈｏｐｈｙｔｏｎ ｍｅｎｔａｇｒｏｐｈｙｔｅｓ※を表し、ＮＤは検出されなかったことを表し、また、ＩＴＳ１は、一応増幅バンドが見られたものの、同定には至らなかったものを表す。

[0053]

ほ 3]

検体番号(No.)	医師の所見			RT-PCRでの判定	dermaF/dermaR			dermaF2/dermaR2	
	真菌鏡検	培養	通常のPCR		FU-ITS1N	TME-ITS1F	TRU-ITS1V	TME-ITS1F	TRU-ITS1V
47	+	−	ND	TR	64	−	195	−	6250
49	+	−	ND	TR	25000	−	200000	−	400000
54	+	同定不能	TR	TR	391	−	3125	−	6250
60	+	TR	TR	TR	50000	−	100000	−	400000
64	+	TR	TM	TM	3125	1563	−	50000	−
66	+	−	ITS1	TR	12500	−	25000	−	391
68	+	CA	ND	TR	12500	−	50000	−	200000
71	+	TM	TM	TM	3125	125000	−	100000	−
86	+	−	ND	TR	195	−	781	−	125000
95	+	−	ND	TR	391		781	−	125000
110	+	発育不良	TM	TM	49	98	−	3125	−
114	+	TR	TM	TM	3125	6250	−	100000	−
118	+	−	ND	TR TM	49	12	48	98	391
121	+	TR	TR TM	TR	24	−	98	−	781
130	+	−	ND	TR	98	−	781	−	125000
140	+	−	ND	TR	125000	−	12500	−	50000
142	+	TR	TR TM	TR	49	−	−	−	49
146	+	−	ND	TR	781	−	781	−	6250
154	+	−	ND	TR	20000	−	80000	−	20000
164	+	−	ND	TR	3125	−	6250	−	6250
167	+	TR	TR	TR	24	−	24	−	98
170	+	−	ND	TR	781	−	391	−	3125
172	+	TR	TR	TR	3125	−	3125	−	50000
175	+	TR	TR	TR	100000	−	100000	−	100000
178	+	TR	TR TM	TR	49	−	12	−	781
182	+	TR	TR TM	TR	25000	−	25000	−	100000
185	+	−	ND	TR TM	1563	−	1563	98	3125
191	+	−	ND	TR	98	−	98	−	391
195	+	TR	TR	TR	1563	−	3125	−	100000
206	+	−	ND	TR	3	−	−	−	391
210	+	TR	TR	TR	3125	−	3125	−	50000
230	+	−	ND	TR	50000	−	25000	−	25000
237	+	TR	TR	TR	25000	−	25000	−	25000
陰性対照					−	−	−	−	−
陽性対照					100000	100000	100000	100000	100000

[0054] 同様な方法で、皮膚白癬の起因菌を同定した結果は表4に示した。

ほ 4]

検体番号 (No.)	医師の所見			RT-PCR での判定	dermaF/dermaR			dermaF2/dermaR2	
	真菌鏡検	培養	通常の PCR		FU-ITS1N	TME-ITS 1F	TRU-ITS 1V	TME-ITS1F	TRU-ITS1V
49 爪	+	TR	TR	TR	50000	−	100000	−	400000
49 皮膚	+	−	ND	TR	49	−	195	−	781
56 爪	+	TM	TM	TM	3125	125000	−	100000	−
56 皮膚	+	TM	TM	TM	25000	25000	−	100000	−
69 爪	+	−	ND	TR	195	−	781	−	12500
69 皮膚	+	−	ITS1	TR	3125	−	50000	−	200000
88 爪	+	発育不良	TM	TM	49	98	−	3125	−
88 皮膚	+	TM	TM	TM	195	195	−	1563	−
91 爪	+	TR	TM	TM	3125	6250	−	100000	−
91 皮膚	+	TM	TM	TM	6250	6250	−	25000	−
95 爪	+	−	ND	TR	391	−	781	−	125000
95 皮膚	+	TM	TM	TM	1563	1563	−	25000	−
121 爪	+	TR	TR TM	TR	24	−	98	−	781
121 皮膚	+	−	ND	TR	781	−	781	−	6250
127 爪	+	−	ND	TR	20000	−	80000	−	20000
127 皮膚	+	−	ND	TR TM	12500	12500	1563	100000	100000
143 爪	+	−	ND	TR	781	−	391	−	3125
143 皮膚	+	TR	TR	真菌	24	−	−	−	781
145 爪	+	TR	TR	TR	3125	−	3125	−	50000
145 皮膚	+	TR	TR	TR	3125	−	50000	−	400000
陰性対照					−	−	−	−	−
陽性対照					100000	100000	100000	100000	100000

産業上の利用可能性

[0055] 本発明の同定方法によれば、爪白癬の起因菌を迅速かつ正確に同定することができ、治療方針の策定に有効な起因菌情報を提供できるため、産業上の利用可能性は大である。

請求の範囲

[請求項1] プライマーセットおよびプローブを含み、リアルタイムＰＣＲ法を用いて爪白癬の起因菌を同定するための同定用キットであって、

前記プライマーセットが、配列番号１の塩基配列を有するプライマーと配列番号２の塩基配列を有するプライマーとからなるプライマーセット、および、配列番号３の塩基配列を有するプライマーと配列番号４の塩基配列を有するプライマーとからなるプライマーセットからなる群より選択される少なくとも一つであり、

前記プローブが、配列番号５の塩基配列を有するプローブ、および、配列番号６の塩基配列を有するプローブからなる群より選択される少なくとも一つである、爪白癬の起因菌の同定用キット。

[請求項2] 被検者より採取した爪から全ＤＮＡを抽出する工程と、

爪白癬の起因菌のリボゾーマルＤＮＡのＩＴＳ１領域に特異的な、プライマーセットおよびプローブを用意する工程と、

リアルタイムＰＣＲ法を用いて、前記プライマーセットによって前記抽出した全ＤＮＡにおける爪白癬の起因菌のリボゾーマルＤＮＡのＩＴＳ１領域を増幅すると同時に、前記プローブによって前記増幅したＤＮＡを検出し、菌種を同定する工程と

を含む、爪白癬の起因菌の同定方法。

[請求項3] 前記プライマーセットが、配列番号１の塩基配列を有するプライマーと配列番号２の塩基配列を有するプライマーとからなるプライマーセット、および、配列番号３の塩基配列を有するプライマーと配列番号４の塩基配列を有するプライマーとからなるプライマーセットからなる群より選択される少なくとも一つである、請求項２記載の爪白癬の起因菌の同定方法。

[請求項4] 前記プローブが、配列番号５の塩基配列を有するプローブ、および、配列番号６の塩基配列を有するプローブからなる群より選択される少なくとも一つである、請求項２または３記載の爪白癬の起因菌の同

定方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2010/071727

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12Q1/68 (2006.01)i, C12N1 5/09 (2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12Q1/68, C12N1 5/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2011
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2011 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2011

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CA/ BIOSIS/MEDLINE (STN), JST Plus / JME DPlus / JST 7580 (JDreaml l)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Arabatzis M. et al., Diagnosis of common dermatophyte infections by a novel multiplex real-time polymerase chain reaction detection/identification scheme, British Journal of Dermatology, 2007, Vol.157, p.681-689	1-4
Y	MAKIMURA Koichi, Species Identification System for Dermatophytes Based on the DNA Sequences of Nuclear Ribosomal Internal Transcribed Spacer 1., Japanese Journal of Medical Mycology, 2001.04.30, Vol.42, p.61-67	1-4
Y	YOSHIDA Eri. et al., Rapid identification of Trichophyton tonsurans by specific PCR based on DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) 1 region, Journal of Dermatological Science, 2006, Vol.42, p.225-230	1-4

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying tiie invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
01 February, 2011 (01.02.11)	15 February, 2011 (15.02.11)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2010/071727

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MOCHIZUKI Takashi et al., Identification of Several Clinical Isolates of Dermatophytes Based on the Nucleotide Sequence of Internal Transcribed Spacer 1 (ITS 1) in Nuclear Ribosomal DNA., The Journal of Dermatology, 1999, Vol.26, p.276-281	1-4
Y	JP 2008-278871 A (Canon Inc.), 20 November 2008 (20.11.2008), entire text & US 2009/0081666 A1	1-4

国際調査報告

国際出願番号 ＰＣＴ／ＪＰ２０１０／０７１７２７

Ａ． 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (ＩＰＣ))

Int.Cl. C12Ql/68 (2006. 01) i, C12N15/09 (2006. 01) i

Ｂ． 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (ＩＰＣ))

Int.Cl. C12Q1/68, C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 １９２２—１９９６年
日本国公開実用新案公報 １９７１—２０１１年
日本国実用新案登録公報 １９９６—２０１１年
日本国登録実用新案公報 １９９４—２０１１年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA/BIOSIS/MEDLINE (STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

Ｃ． 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー水	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
Y	Arabatzis M. et al. , Diagnosis of common derraatopnyte infections by a novel multiplex real-time polymerase chain reaction detection/ identification scheme, British Journal of Dermatology, 2007 , Vol. 157 , p. 681—689	1-4
Y	MAKIMURA Koicm, Species Identification System for Dermatophytes Based on the DNA Sequences of Nuclear Ribosomal Internal Transcribed Spacer 1., 日本医真菌学会雑誌, 2001. 04. 30 , Vol. 42 , p. 61-67	1-4

☑ c 欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願 日前の出願または特許であるが、国際出願 日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願 日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「T」国際出願 日又は優先 日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送 日
０１．０２．２０１１	１５．０２．２０１１

国際調査機関の名称及びあて先	特許庁審査官 (権限のある職員)	
日本国特許庁 (ＩＳＡ／ＪＰ) 郵便番号１００—８９１５ 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	松原 寛子	４Ｎ ４１５４
	電話番号 ０３—３５８１—１１０１ 内線 ３４８８	

様式ＰＣＴ／ＩＳＡ／２１０ (第２ページ) (２００９年７月)

C（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
Y	YOSHIDA Eri. et al. , Rapid identification of Trichophyton tonsurans by specific PCR based on DNA sequences of nuclear ribosomal interna 丄 transcribed spacer (ITS) 1 region, Journal of Derraatological Science, 2006 , Vol. 42 , p. 225—230	1-4
Y	MOCHIZUKI Takashi. et al. , Identification of Several Clinical Isolates of Dermatophytes Based on the Nucleotide Sequence of Internal Transcribed Spacer 1 (ITS 1) in Nuclear Ribosomal DNA. , The Journal of Dermatology, 1999 , Vol. 26 , p. 276—281	1-4
Y	JP 2008-278871 A（キヤノン株式会社）2008. 11. 20, 全文 & US 2009/0081666 AI	1-4